

# PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnumm	ner: WO 00/65036
C12N 15/00		(43) Internationales	
'		Veröffentlichungsdatum: 2. 1	November 2000 (02.11.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/03465

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. April 2000 (17.04.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 18 949.8

27. April 1999 (27.04.99)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK-TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHTENTHALER, Hartmut [DE/DE]; Im Kennental 17, D-76227 Karlsruhe (DE). SCHWENDER, Jörg [DE/DE]; Seltenbachstrasse 5, D-76327 Pfinztal (DE). REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT: D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA. BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: OVEREXPRESSION OF A DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DESOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE REDUCTOI-SOMERASE IN PLANTS
- DNA-SEQUENZ I-DES-(54) Bezeichnung: ÜBEREXPRESSION **EINER** CODIEREND FÜR **EINE** OXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT REDUKTOISOMERASE IN PFLANZEN

### (57) Abstract

The invention relates to a method for producing plants containing increased quantities of tocopherols, vitamin K, carotinoids, chlorophylls and polyterpenes by overexpression of a DXPRI gene.

#### (57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland ,	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑŪ	Australien	GA	Gabun .	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
B8	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vo
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
Cı	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	น	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

#### 5 Beschreibung

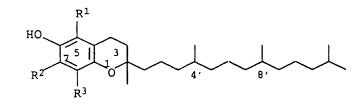
Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend für ein Polypeptid mit 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase(DXPRI)-Aktivität pflanzlichen Ursprungs. Zudem betrifft die Erfindung die

10 Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit DXPRI-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, speziell die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit dieser hybridisierenden DNA-Sequen-

15 zen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bis20 her die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern,
Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch
auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

25 Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (la-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten 30 des Tocotrienols (2a- d):



1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$ 

**40** 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ 

1c, y-Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = R^3 = CH_3$ 

1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$ 

2

2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$ 

2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ 

**10** 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = R^3 = CH_3$ 

2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$ 

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

15 Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits beispielsweise der Tocopherol-Gehalt bzw. der Gehalt des gewünschten Stoffwechselendpro-

20 duktes bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teil-

25 weise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre beispielsweise die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, beispielsweise 30 die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus  $C_5$ -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.

- **40** Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophylle, Tocopherole und Vitamin K) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.
- 45 Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über ß-Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C5), dem Isopentenyl-

pyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit  $C^{13}$  gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird (Abbil-

- 5 dung 1). Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt
- 10 (Lange et al, 1998; Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997; Lichtenthaler et al, 1997; Sprenger et al, 1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung durch die DXPRI in 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und im weiteren zu IPP umgesetzt (Arigoni et al, 1997; Zeidler et al, 1998). Biochemische
- 15 Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeein-
- 20 flußt ist (Bach & Lichtenthaler, 1993). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997).
- 25 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C10) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C15) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen
- 30 (C20) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C40-Vorläufer für Carotinoide.

Bei gemischten Prenyllipiden ist die Isopren-Seitenkette ver35 schiedener Länge mit Nicht-Isopren Ringen verbunden wie
beispielsweise ein Porphyrin-Ring bei Chlorophyll a und b. Die
Chlorophylle und Phylloquinone enthalten eine C20 Phytyl-Kette,
in der nur die erste Isopren-Einheit eine Doppelbindung enthält.
GGPP wird durch die Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase

**40** (GGPPOR) zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone,

45 deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homo-

gentisinsäure überführt wird. Das Chorismat wird einerseits über Erythrose-4-Phosphat, 3'-Dehydrochinat, 3'-Dehydroshikimat, Shi-kimat, Shikimat-3-Phosphat und 5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat gebildet (Abb. 1). Dabei werden Fruktose-6-Phosphat und Glyce-

- 5 rinaldehyd-3-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat umgesetzt. Die oben beschriebene Homogentisinsäure wird anschließend an PPP gebunden, um den Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als
- 10 Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\alpha$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).
- 15 In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotino-
- 20 id-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-
- 25 Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996)).
- 30 Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.

- Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXPRI)-Gens in den Pflanzen.
- 45 Um beispielsweise den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in die Tocopherol-Biosynthese zu verstärken, wurde die Bildung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P als essentiellem Ausgangssubstrat

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Pflanzen die Aktivität der DXPRI durch Überexpression des DXPRI-Gens aus Arabidopsis thaliana erhöht. Dies kann prinzipiell auch durch Expression homologer oder heterologer DXPRI-Gene erreicht werden. Eine Nukleotidsequenz codierend für eine DXPRI wurde aus E.coli beschrieben ( Accession Nummer AB 013300; Kuzuyama et al., 1998; Takahashi et al., 1998).

- In Beispiel 1 wird erstmals ein pflanzliches DXPRI-Gen (Abb. 2, 10 SEQ-ID No. 1) aus Arabidopsis thaliana beschrieben und in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten wird der DXPRI-Nukleotidsequenz aus Arabidopsis thaliana eine Transitsignalsequenz (Abb. 3, Abb. 4) vorangestellt. Fragment A (529 bp) in Abbildung 4 beinhaltet den 35S-
- 15 Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
- 20 1984) zur Transkriptionstermination. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DXPRI-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.
- 25 Das durch die zusätzliche Expression des DXPRI-Gens nun vermehrt zur Verfügung stehende 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-P wird weiter in Richtung Tocopherole, Carotinoide, Vitamin K, Chlorophylle und Polyterpene umgesetzt.
- 30 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DXPRI-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen wurden Tabak und Raps eingesetzt.
- Antisensekonstrukte sowie homologe bzw. heterologe pflanzliche DXPRI-Gene wurden unabhängig voneinander in Pflanzen transformiert (Abb. 5). Fragment A (529 bp) in Abbildung 5 beinhaltet den
- 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis
  40 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase (Abbildung 3). Fragment E beinhaltet das Gen der DXPRI in Antisense-Orientierung. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur
- 45 Transkriptionstermination. Messungen an DXPRI-Antisensepflanzen ergaben bezüglich des Gehaltes an Tocopherolen und Carotinoiden eine drastische Abnahme. Dies belegt den direkten Einfluß der

plastidären pflanzlichen DXPRI auf die Synthese von Carotinoiden und Tocopherolen.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz

5 SEQ-ID No. 1 aus Arabidopsis thaliana, die für eine DXPRI oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DXPRI kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherolen, Carotinoiden, Vitamin K, Chlorophyllen und Polyterpenen verleihen.

15

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende

- 20 der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DXPRI-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle
- 25 Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind
- 30 Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et

35 al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 6 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promo-

- **40** tor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):
  - HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
  - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- 45 PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor

- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder 5 Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980),

10 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

15

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DXPRI-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRPI-Promotor (Ward

- 20 et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklininduzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch
- 25 Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen 30 beispielsweise die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 35 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0.67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen expri-

- 40 miert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und
- **45** Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DXPRI-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DXPRI-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transit5 peptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

- Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. En10 quist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,
  Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc.
  and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 15 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.
- 20 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).
- 25 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DXPRI-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DXPRI-Gens
- 30 in die Chloroplasten vom DXPRI-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären DXPRI oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet
- 35 ist.

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem

40 ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

#### pTP09

.

 ${\tt TAAGGTCACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACTGAGACTGCGGGATCC\_BamHI}$ 

pTP10

5

pTP11

- 20 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DXPRI kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DXPRI-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthe-
- 25 tische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können ver-
- 30 schiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker
- 40 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze
- **45** sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DXPRIGEn codiert und eine Region für die transkriptionale Termination.

Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnitt5 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten
10 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden
der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das An15 hängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-25 Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

- 30 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.
- Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DXPRI-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien
- 40 können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von
- 45 Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von

11

S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Ex-5 pression eines DXPRI-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DXPRI kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzli-10 che funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

15

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. 20 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet

sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung 25 einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen der 30 Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie 35 deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen 40 und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Tocophero-

len, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyll und Polyterpenen eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird 45 als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 – 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 – 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja,

20 Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DXPRI-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle
Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der

30 hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze
angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DXPRI kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DXPRI-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

5 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Über-expression des DXPRI-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-10 setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DXPRI-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DXPRI-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren 25 Hilfe ein Nachweis auf DXPRI-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DXPRI-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

30 Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DXPRI-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherolen beispielsweise ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression

40 des DXPRI-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze – beispielsweise in fetthaltigen Samen – gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DXPRI-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DXPRI-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DXPRI-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen gete-10 stet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie 15 transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß-20 und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

- 25 Da es sich bei diesem Biosyntheseweg um einen ausschließlich chloroplastidär-lokalisierten Stoffwechselweg handelt, bietet er optimale Targetenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren. Da sich nach heutigem Stand der Technik kein mit der Arabidopsis thaliana DXPRI identisches oder ähnliches Enzym in anderen höhe-
- 30 ren Organismen befindet, ist davon auszugehen, daß Inhibitoren sehr spezifisch auf Pflanzen wirken sollten. Der Wirkort eines Inhibitors, Fosmidomycin (3-(N-formyl-N-hydroxyamino)-propyl-phosphonsäure; Fujisawa Pharmaceutical Co.) konnte als DXPRI identifiziert werden. Im biochemischen Assay findet man eine ef-
- 35 fektive Hemmung der enzymatischen Aktivität (Abb. 7). Folgende Abkürzungen wurden in Abb. 7 verwendet: DOX = 1-Deoxy-D-xylulose, ME = Methylerythritol. Die gleiche Wirkung findet man in einem Pflanzenassay, in dem Gerstenkeimlinge nach Fosmidomycinwirkung auf ihren Chlorophyll- und Carotinoidgehalt untersucht werden.
- **40** Beide Substanzen, die sich aus Vorläufern des Isoprenoidstoffwechsels ableiten, sind in ihren Mengen stark erniedrigt (Abb. 8).

Durch Überexpression der für eine DXPRI kodierenden Gensequenz 45 SEQ-ID NO. 1 bzw. SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI erreicht

werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

15

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

5

10

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DXPRI durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen, Carotinoiden und Polyterpenen durch Expression einer DXPRI DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 25 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

- 30 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von
  DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von
- 35 Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue)

  40 wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation
  verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1
  mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et
  al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ
  können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere
- 45 geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitro-

PCT/EP00/03465 WO 00/65036 16

gen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

5 Sequenzanalyse rekombinanter DNA

(Accession Nummer AB009053).

Funktionalität untersucht wurde.

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger 10 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

Klonierung der Arabidopsis thaliana DXPRI

15

Ausgehend von der in der Genbank abgelegten Sequenz der E. coli DXPRI konnten in Gendatenbanken andere DXPRI-homologe bakterielle Proteinsequenzen identifiziert werden. Ein Vergleich der je lediglich 400 Aminosäuren langen Proteinsequenzen zeigte mehrere 20 konservierte Aminosäure-Sequenzmotive. Ein solches Motif zeigte Homologien mit einer abgelegten genomischen Arabidopsis-Sequenz

Da die bakteriellen DXPRI-Sequenzen nahe am vermeintlichen N-Ter-25 minus eine konservierte Aminosäurensequenz aufweisen, wurde der Beginn eines funktionellen Teils der Arabidopsis-DXPRI-Sequenz sehr genau in abgelegten genomischen Sequenzen lokalisiert. Das C-terminale Ende der Sequenz (Stop-Codon) konnte durch einen Vergleich mit dem EST-Klon (Accession Nummer AA586087) gefunden wer-30 den. Es wurde ein 1215 bp großes Fragment der DXPRI kloniert, welches durch heterologe Expression auf enzymatische

Es wurde mRNA aus Arabidopsis thaliana (var. Columbia) isoliert 35 und cDNA (nach Herstellerangaben Stratagene) erzeugt. Es wurden aus den Sequenzen AB009053 und AA586087 PCR-Primer abgeleitet, mit welchen aus der hergestellten cDNA ein 1215 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Der Primer ATRv3 besitzt eine BamHI-Schnittstelle und ist so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und

- 40 Ligation in pBluescript oder pET5b (Expressionsplasmid; Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteintranslation einligiert wird.
  - 5' TCAGGATCCGGCGCCTCGTCAATCT 3' Atrv3
- 5' GACGAATTCTTCTTCCAACAACCAATTCT 3' 45 Atrr1

Die Primer Atrv3 und Atrr1 enthielten eine BamHI- bzw. eine EcoRI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (Atrv3/Atrr1) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und EcoRI verdaut. Zur Ligation wurden

PCT/EP00/03465

5 der Vektor pET5b ebenfalls mit BamHI und EcoRI geschnitten. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* XL1Blue (Stratagene) transformiert.

Das Plasmid pET5bAtr enthält ein Genfragment kodierend für DXPRI 10 aus Arabidopsis thaliana. Dessen Sequenz wurde bestimmt (Abbildung 2, SEQ-ID No.1). Die aus dem Plasmid pEt5bAtr erhaltene Nucleotid-Sequenz läßt sich mit den Sequenzen AB009053 und AA586087 abgleichen. Demnach enthält die genomische Sequenz AB009053 10 Introns.

15

Beispiel 2

Klonierung der Arabidopsis thaliana DXPRI in den Expressionsvektor pET5bAtr und Nachweis der enzymatischen Aktivität.

20

Der Expressionsvektor pET5b (Promega) ist ein Expressionsvektor für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Das Plasmid ist abgeleitet von pBR322 und trägt für die Expression einen Bakteriophage T7-Promotor. Zur Expression wird das Plasmid in einem

- 25 E. coli-Stamm vermehrt, welcher ein induzierbares Gen für die T7-Polymerase trägt (z.B. JM109(DE3); Promega). Die Expression des rekombinanten Proteines wird aktiviert über die Induktion der T7-Polymerase.
- 30 pET5bAtr codiert für ein Fusionsprotein mit 420 Aminosäuren Länge. Die Aminosäuren 1 bis 14 stammen aus pET5b (Fusionspeptid; Abbildung 3). Die Aminosäuren 15 bis 420 stammen aus dem klonierten DXPRI-Fragment (Abb. 2). In Abb. 3 ist die DNA-Sequenz für das Fusionspeptid unterstrichen. Aus der gesamten Sequenz läßt sich ein Molekulargewicht von 45,6 KDa für das Protein berechnen.

Der transgene Stamm wurde im Anzuchtsmedium "2x YT" (pro 1 1: Bacto-Trypton 16 g, Hefe-Extrakt 10 g, NaCl 5g) inkubiert. Die Anzucht erfolgte bei  $37^{\circ}$ C bis zu einer  $OD_{560~nm}$  von 0,6. Nach Zu-

40 gabe von IPTG (1mM) erfolgte das Wachstum weitere 10 min bei 37°C, dann weitere 4h bei 22° bis zur Ernte. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1% NaCl gewaschen. Nach Aufbruch der Zellen (50 bis 500 ml Zellkultur (OD<sub>560 nm</sub> von 1,0) mittels French Press wurde ein Protein-Rohextrakt für Enzymtests verwendet (in 4 ml Extraktionspuffer (Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, PMSF

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

18

0,1 mM). Zur Aufbewahrung wurden die Rohextrakte mit 20% Glycerin bei  $-20^{\circ}$ C eingefroren.

Für den Enzymtest wurden 15  $\mu$ l (auf 1 bis 7 mg Protein/ml ver-5 dünnt) Proteinextrakt mit MnCl<sub>2</sub> (1 mM), NaF (5 mM), NADPH<sub>2</sub> (0,5 mM) und <sup>14</sup>C-1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (0,25 mM, 3 KBq) für 30 min. bei 30°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte bei 100°C (30 sec.) durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (auf 100 mM) und alkalischer Phosphatase (0.5 units). Das Dephosphorylieren des Produk-

- 10 tes erfolgte für 2h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Produktes auf Kieselgel 60 (Merck) mit Aceton/Ethylacetat/Wasser (50+50+2) mit anschließender Auswertung via Instant Imager. Man erhält 1-Deoxy-D-xylulose (DOX; Rf 0,4) und Methylerythritol (ME; Rf 0,2). Ab-
- 15 bildung 9 gibt die dünnschichtchromatographische, autoradiographische Auswertung nach heterloger Expression der DXPRI aus Arabidopsis thaliana in E. coli und Enzymassay bei Einsatz verschiedener Gesamt-Proteinkonzentrationen (μg Protein/μl) wieder.
  K = Kontrolle E. coli JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b ohne DXPRI.
- 20 Proben: E. coli JM 109 (DE3) mit Plasmid pET5b mit DXPRI aus Arabidopsis thaliana. Die Bildung von ME kann effektiv inhibiert werden durch Verwendung von Fosmidomycin in verschiedenen Konzentrationen. Dies zeigt den "mode-of-action" von Fosmidomycin als Inhibitor der DXPRI.

25

Beispiel 3

Herstellung des Substrats 1-Desoxy-p-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) für den Enzymassay

30

Für die Herstellung von DOXP wurde aus Chlamydomonas reinhardtii klonierte DOXS verwendet (pET5b, E. coli JM109(DE3)).

Enzymextrakte aus mit IPTG induzierten *E. coli-*Zellen wurde mit 35 [3-14C]-Pyruvat und DL-GAP inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt nach 30 min. durch Hitzedenaturierung der Proteine. Nach Abzentrifugieren wurde der Umsatz des radioaktiven Pyruvats mittels DC/Autoradiographie überprüft und der Überstand als Substrat für die Reduktoisomerase verwendet.

40

DOXP als Reaktionsprodukt wurde nach folgenden Kriterien identifiziert:

 Es entsteht ein radioaktives Produkt, welches nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase sich in DC-Trennungen weniger polar verhält. Dies legt nahe, daß ein phosphoryliertes Produkt aus <sup>14</sup>C-Pyruvat und GAP gebildet wurde.

5

- 2. Das dephosphorylierte Produkt läuft in der DC (Kieselgel, Aceton/Ethylacetat/Wasser-50/50/2) gleich mit einer synthetischen Probe von 1-Desoxy-D-Xylulose.
- Der Reaktionsansatz enthielt Proteinextrakt (20  $\mu$ l/100 $\mu$ l Ansatz), Tris/HCl (pH 7.5) 100 mM, DTT 2 mM, MgCl $_2$  5 mM, NaEDTA 500  $\mu$ M, PMSF 100  $\mu$ M, NaF 5 mM, TPP 1 mM, Na-Pyruvat 1 mM, Na-[2- $^{14}$ C] Pyruvat 20 KBq/100  $\mu$ l und DL-Glycerinaldehyd-3-Phosphat 3,75 mM.

15

#### Beispiel 4

Klonierung der *Arabidopsis thaliana* DXPRI in den Pflanzentransformationsvektor pBin19AR-TP

20

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor wurden die Primer so gewählt, daß nach Restriktionsverdau und Ligation in pBin19AR-TP (Promega) die kodierende Sequenz ab der N-terminalen ersten konservierten Sequenz im Leserahmen der Proteintranslation 25 einligiert wird.

AtrvpBin1 5' TCAGGATCCGGCGCCTCGTCAATCT 3'
AtrrpBin2 5' GACCCCGGGTTCTTCCAACAACCAATTCT 3'

- 30 Die Primer AtrvpBin1 und AtrrpBin2 enthielten eine BamHI- bzw. eine SmaI-Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR-Produkt (AtrvpBin1/AtrrpBin2) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit BamHI und SmaI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit BamHI und SmaI ge-
- 35 schnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 4 dargestellt.

#### 40 Beispiel 5

Herstellung von DXPRI-Antisense-Konstrukten

Zur Klonierung der DXPRI in einen binären Vektor in Antisense-45 Orientierung wurden folgende Primer gewählt.

AtrvpBin3 5' TCA<u>CCCGGG</u>GGCGCCTCGTCAATCT 3'

AtrrpBin4

#### 5' GACGGATCCTTCTTCCAACAACCAATTCT 3'

Die Primer AtrvpBin3 und AtrrpBin4 enthielten eine SmaI- bzw.
eine BamHI- Schnittstelle (jeweils unterstrichen). Das PCR5 Produkt (AtrvpBin3/AtrrpBin4) wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und mit SmaI und BamHI verdaut. Zur Ligation wurden der Vektor pBin19AR-TP ebenfalls mit SmaI und BamHI geschnitten, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Das Konstrukt ist in Abbildung 5 dargestellt.

Tabakpflanzen mit reduzierter DXPRI-Aktivität wurden einer Selbstung unterzogen und der erhaltene Samen geerntet. Zur weiteren 15 Analyse der Pflanzen wurde Samen aus der Fl-Generation verwendet.

Alle untersuchten Antisense-Pflanzen zeigten hinsichtlich der Pflanzengröße deutliche Unterschiede auf. Es wurden Pflanzen gefunden, die die gleiche Größe hatten wie der Wildtyp, bis hin zu 20 ganz kleinen Pflanzen. Die nachfolgenden Generationen waren also nicht einheitlich. Dies gilt auch für die Reduktion in der DXPRI-Aktivität, die innerhalb einer Linie nicht einheitlich war, d.h. man kann eine Linie nicht durch eine spezifische Reduktion in der DXPRI-Aktivität definieren, sondern die Linien spalten auf (Sedobeptulose-1,7-Bisphosphatase-antisense-Tabak-Pflanzen weisen ein vergleichbares Phänomen auf; vgl. Harrison et al. 1998, Planta 204: 27-36).

Die Biomassen-Analyse ergab eine Korrelation zwischen Reduktion 30 der DXPRI-Aktivität und Reduktion in der Biomasse.

Beispiel 6

Extraktion und Detektion von Tocopherol

35

#### Extraktionsverfahren:

- 100 mg Feuchtgewicht Blattmaterial
- Extraktionspuffer: 80 % Ethanol, 10 mM Hepes pH 7,0, 1 mM
- 40 Ascorbat
  - Extraktion: 1:5 ( w/v)
  - Inkubation bei 50°C, 30 Minuten
  - Keine Zentrifugation
  - Zugabe von ½ Volumen n-Hexan zu dem Extrakt
- 45 Vortex und Zentrifugation (5 Minuten, Raumtemperatur)
  - Gewinnung der oberen sehr grün gefärbten Phase
  - Wiederholung der n-Hexan Extraktion mit der unteren Phase

Vereinigung der n-Hexan Phasen

- Vakuum Trocknung ( 2-3 Stunden für 1 ml n-Hexan bei Raumtemperatur )
- Wiederauflösung des Rückstandes in ca. 1/5 des ursprünglichen
- 5 n-Hexan Volumens
  - Injektion von 30 50 μl auf die HPLC
  - HPLC-Detektion für Tocopherol
  - Detektion der Fluoreszenz: Anregung bei 295 nm, Emission bei 330 nm
- 10 Säule: RP-18 ( Nucleosil 100, C18, 3μm, Fa. Knauer )
  - Isokratisches System: n-Hexan plus 0,2 % 2-Propanol
  - Fluß: 0,8 ml/min ( Druck: 110 bar )
  - Standards von Sigma oder Merck
  - Laufzeit: 15 Minuten

15

Beispiel 7

Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern und HPLC-Analytik

20 Die Extraktion phenolischer Substanzen aus Blättern wurde wie bei Yao et al., The Plant Cell, 7 (1995), 1787 - beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

25

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen

(Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN).

- 30 Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DXPRI (SEQ-ID No. 1), kloniert wie in Beispiel 4 beschrieben in den Transformationsvektor pBin19AR-TP, transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer
- 35 unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension
- 40 gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin
- **45** (BAP), 0:2mg/l Naphtylessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf

hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 9

5

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (Brassica napus)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Proto-10 koll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

- 15 Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium tumefaciens Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden das bereits in Beispiel 4 beschriebene binäre Konstrukt mit der gesamten cDNA der DXPRI aus Arabidopsis thaliana ( SEQ-ID No.1 ) verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren
- 20 wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v
- 25 Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem  $H_2O$  für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices
- 30 entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

- Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der
- 40 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD600 von 0.3 eingestellt.
- 45 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-

Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-5 Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-10 fernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor 15 verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in 20 Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 10

25

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak

Die Überexpression der DXPRI aus Arabidopsis thaliana in Tabak erfolgte wie in Beispiel 8 beschrieben.

30

Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Takakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Verg-35 leich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Beispiel 11

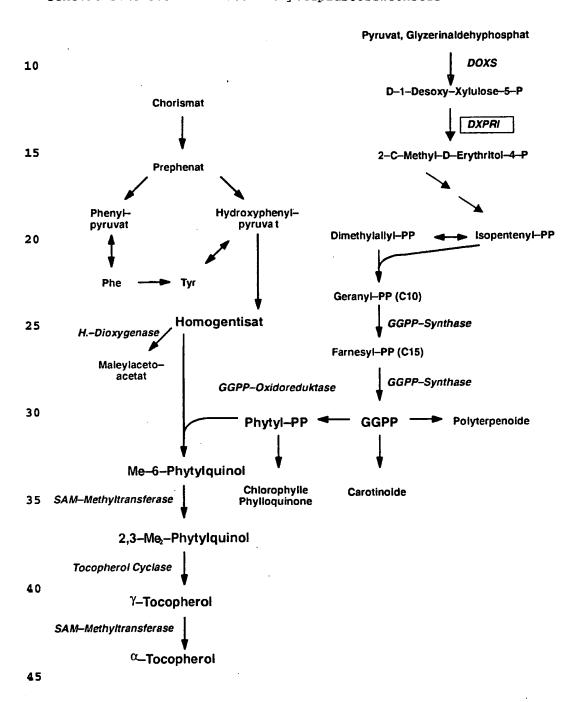
Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

40

Die cDNA der DXPRI aus Arabidopsis thaliana (SEQ-No.1) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherol-

45 gehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der lpha-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha\text{-Tocopherolkonzentration}$  im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

5 Abbildung 1 Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels



PCT/EP00/03465 WO 00/65036 25

Abbildung 2

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus Arabidopsis thaliana

- 5 GCGCCTCGTCAATCTTGGGATGGACCAAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTTCTATTGG CACTCAGACATTGGGTTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTCAGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTG GTTCGAATGTTACTCTACTTGCTGATCAGGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGA AACGAGTCACTGATTAATGAGCTTAAAGAGGCTTTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATTAT TCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCGACATCCCGAAGCTGTAACCGTTGTTACCGGAA 10 TAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTGCTGCAATTGAAGCAGGAAAGGACATTGCTCTT GCAAACAAGAGACATTAATCGCAGGTGGTCCTTTCGTGCTTCCGCTTGCCAACAACATAATGT AAAGATTCTTCCGGCAGATTCAGAACATTCTGCCATATTTCAGTGTATTCAAGGTTTTGCCTGAAG GCGCTCTGCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGAGCTTTTAGGGATTGGCCTGTCGAAAAG CTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTCATCCGCAAAGTATCATACATTCCATGATTGAAACA CAGGATTCATCTGTGCTTGCTCAATTGGGTTGGCCTGATATGCGTTTACCGATTCTCTACACCAT GTCATGGCCCGATAGAGTTCCTTGTTCTGAAGTAACTTGGCCAAGACTTGACCTTTGCAAACTCG 20 GGACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTCAGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTT CATTGATGAAAAGATAAGCTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATC GAAACGAGTTGGTAACATCACCGTCTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTGTGGGCACGTGAA
- 25

Abbildung 3

Nukleotid-Sequenz der DXPRI aus Arabidopsis thaliana als Fusionssequenz

30

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCGGCGCCCTCG 1

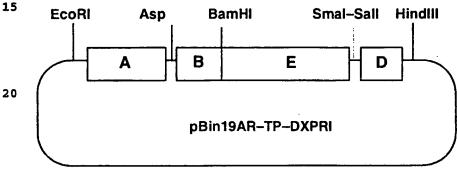
- TCAATCTTGGGATGGACCAAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTT
- 101 CTATTGCCACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTC
- 151 AGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTGGTTCGAATGTTACTCTACTTGCTGATCA
- 35 201 GGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGAAACGAGTCACTGA
  - 251 TTAATGAGCTTAAAGAGGCTTTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATT 301 ATTCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCGACATCCCGAAGCTGT
  - 351 AACCGTTGTTACCGGAATAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTG
- 40 451 ATCGCAGGTGGTCCTTTCGTGCTTCCGCTTGCCAACAACATAATGTAAA
  - 501 GATTCTTCCGGCAGATTCAGAACATTCTGCCATATTTCAGTGTATTCAAG
  - 551 GTTTGCCTGAAGGCGCTCTGCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGA
  - 601 GCTTTTAGGGATTGGCCTGTCGAAAAGCTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGGA
- 651 TGCGTTGAAGCATCCAAACTGGAACATGGGAAAGAAAATCACTGTGGACT 45 701 CTGCTACGCTTTTCAACAAGGGTCTTGAGGTCATTGAAGCGCATTATTTG

- 851 GTTGGCCTGATATGCGTTTACCGATTCTCTACACCATGTCATGGCCCGAT
- 901 AGAGTTCCTTGTTCTGAAGTAACTTGGCCAAGACTTGACCTTTGCAAACT
- 1001 ATCTTGCTTATGCTGCTGGACGACCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTC
- 5 1051 AGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTTCATTGATGAAAAGATAAG
  - 1101 CTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATCGAA
  - 1151 ACGAGTTGGTAACATCACCGTCTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTG
  - 1201 TGGGCACGTGAATATGCCGCGAATGTGCAGCTTTCTTCTGGTGCTAGGCC
  - 1251 AGTTCATGCATGAAGAATTGGTTGTTGGAAGAAGAATTC

10

### Abbildung 4

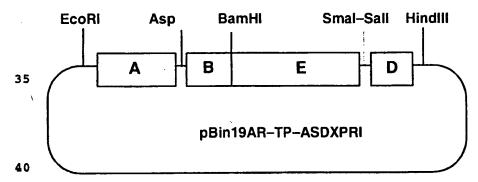
Binärer Vektor zur Überexpression des DXPRI-Gens aus Arabidopsis thaliana im Plastiden transgener Pflanzen



25

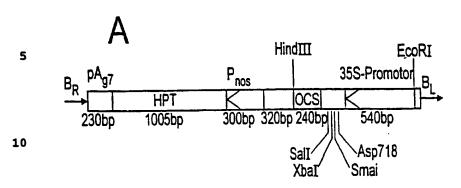
Abbildung 5

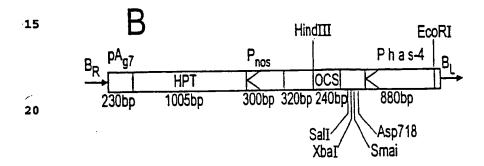
Binärer Vektor zur Antisense-Expression des DXPRI-Gens aus Arabi-30 dopsis thaliana im Plastiden transgener Pflanzen



WO 00/65036 PCT/EP00/03465 27

Abbildung 6





25 Abbildung 7

Nachweis der Hemmbarkeit mit Fosmidomycin und Cofaktorbedarf der DXPRI:

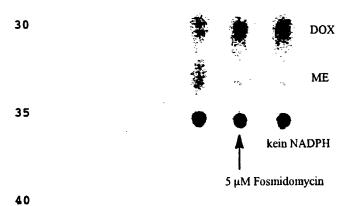


Abbildung 8

Einfluß von Fosmidomycin auf die Neubildung von Pigmenten in etiolierten Gerstenkeimlingen

5

10		Chlorop µg / g TG bzw. Hem in %	-	Carotin µg/gTC bzw. Her in %	G	Pigment-Verhält- nisse a (a+b) b (x+c)			
15	Kontrolle Fosmido- mycin	4361	(0 %)	603	(0 %)	3.65	7.2		
20	10 <sup>-6</sup> M 10 <sup>-5</sup> M	4201 2747	(4 %) (37 %)	552 179	(8 %) (70 %)	3.59 4.74	7.6 15.3		
	10 <sup>-4</sup> M	428	(91 %)	0	(100 %)	12.32	∞		

## 25 Abbildung 9

Heterologe Expression der DXPRI aus Arabidopsis thaliana in E. coli

30
27 2 5 10 20 50 100 μg Protein / 20 μ/

Κ
35 ΜΕ

#### Patentansprüche

- DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und damit hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine pflanzliche 1-Desoxy-D-Xylu-lose-5-Phosphat Reduktoisomerase.
- Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
- Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen.
- 4. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
- 25 5. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
  - 6. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
  - 7. Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5.

40

35

8. Pflanze nach Anspruch 7, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen

## 5 Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.

10

15

20

25

30

35

40

#### SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF AG <120> Ueberexpression einer DNA-Sequenz codierend fuer eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase in Pflanzen <130> 990380 <140> 0050-49943 <141> 1999-04-27 <160> 4 <170> PatentIn Vers. 2.0 <210> 1 <211> 1221 <212> DNA <213> Arabidopsis thaliana <220> <221> CDS <222> (1)..(1221) <400> 1 gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca aaa ccc atc tct atc gtt gga Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly 10 tot act ggt tot att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn 20 25 cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act 144 Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr 45 35 .cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt 192 Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val 50 55 aga aac gag tca ctg att aat gag ctt aaa gag gct tta gct gat ttg Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu 70 75 80 65

gac tat aaa ctc gag att att cca gga gag caa gga gtg att gag gtt Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val

			_			_	_								Ala 175		320
	_	_													tgg Trp		576
															cat His		624
															ctt Leu		672
A															gct Ala		720
			-												cat His 255		768
	_														tgg Trp		816
g	at	atg	cgt	tta	ccg	att	ctic	tac	acc	atg	tca	tgg	ccc	gat	aga	gtt	864

Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val

	-		_	gta Val				_	-		_		 912
	_			aag Lys			_						960
	_		-	gct Ala 325		_	-			_		 _	1008
-	-	_		gag Glu									1056
				atc Ile									1104
				gta Val									1152
-				cgt Arg									1200
_			_	cat His 405	_	tga							1221
.01	0. 0												
	0> 2 1> 4	0.6											
	1 > 4:												

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly
1 5 10 15

Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn  $20 \\ 25 \\ 30 \\$ 

Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr 35 40 45

- Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val 50 55 60
- Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu 65 70 75 80
- Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly Glu Gln Gly Val Ile Glu Val 85 90 95
- Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val Val Thr Gly Ile Val Gly Cys 100 105 110
- Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile 115 120 125
- Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu 130 135 140
- His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu 165 170 175
- Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro 180 185 190
- Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro 195 200 205
- Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe 210 215 220
- Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu 225 230 235 240
- Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser 245 250 255
- Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro 260 265 270
- Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val 275 280 285
- Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly 290 295 300
- Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp

<221> CDS <222> (1)..(1263)

<400> 3 atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ccg gcg cct 48 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro 10 5

cgt caa tot tgg gat gga coa aaa coc ato tot ato gtt gga tot act Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr 25 30 20

ggt tot att ggc act cag aca ttg gat att gtg gct gag aat cot gac 144 Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp 40 35

aaa ttc aga gtt gtg gct cta gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt 192 Lys Phe Arg Val Val Ala Leu Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu 50 55

gct gat cag gta agg aga ttt aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac 240 Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn

cta aag cct acg gtt gct gca att gaa gca gga aag gac att gct ctt 432 Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu 130 135 140

gca aac aaa gag aca tta atc gca ggt ggt cct ttc gtg ctt ccg ctt 480
Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu
145 150 155 160

gcc aac aaa cat aat gta aag att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct 528 Ala Asn Lys His Asn Val Lys Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser . 165 170 175

gcc ata ttt cag tgt att caa ggt ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag 576
Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys
180 185 190

ata atc ttg act gca tct ggt gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa 624

Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu
195 200 205

aag cta aag gaa gtt aaa gta gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg 672
Lys Leu Lys Glu Val Lys Val Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp
210 215 220

aac atg gga aag aaa atc act gtg gac tct gct acg ctt ttc aac aag
Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys
225 230 235 240

ggt ctt gag gtc att gaa gcg cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac 768
Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp
245 250 255

gat ata gag att gtc att cat ccg caa agt atc ata cat tcc atg att
Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile
260 265 270

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

_							ctt Leu 280							atg . Met	864
_							atg Met								912
	_	_				_	ctt Leu	_		_				-	960
		_					gtg Val								1008
	_						ggc Gly								1056
-							atg Met 360								1104
	_						gaa Glu								1152
	_	-					ctt Leu					_			1200
							aat Asn								1248
	-		gca Ala 420	tga	aga	attg	gtt	gttg	gaag	aa g	aatt	С			1289

<210> 4

<211> 420

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Ala Pro

wo	00/65	036					8							PC1	YEP00
1			,	5			0		10					15	
Arg	Gln	Ser	Trp 20	Asp	Gly	Pro	Lys	Pro 25	Ile	Ser	Ile	Val	Gly 30	Ser	Thr
Sly	Ser	Ile 35	Gly	Thr	Gln	Thr	Leu 40	Asp	Ile	Val	Ala	Glu 45	Asn	Pro	Asp
Lys	Phe 50	Arg	Val	Val	Ala	Leu 55	Ala	Ala	Gly	Ser	Asn 60	Val	Thr	Leu	Leu
Ala 65	Asp	Gln	Val	Arg	Arg 70	Phe	Lys	Pro	Ala	Leu 75	Val	Ala	Val	Arg	Asn 80
Glu	Ser	Leu	Ile	Asn 85	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala 90	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp 95	Tyr
Lys	Leu	Glu	Ile 100	Ile	Pro	Gly	Glu	Gln 105	Gly	Val	Ile	Glu	Val 110	Ala	Arg
His	Pro	Glu 115	Ala	Val	Thr	Val	Val 120	Thr	Gly	Ile	Val	Gly 125	Суѕ	Ala	Gly
Leu	Lys 130	Pro	Thr	Val	Ala	Ala 135	Ile	Glu	Ala	Gly	Lys 140	Asp	Ile	Ala	Leu
Ala 145		Lys	Glu	Thr	Leu 150	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro 155	Phe	Val	Leu	Pro	Leu 160
Ala	Asn	Lys	His	Asn 165	Val	Lys	Ile	Leu	Pro 170	Ala	Asp	Ser	Glu	His 175	Ser
Ala	Ile	Phe	Gln 180	Cys	Ile	Gln	Gly	Leu 185	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu 190	Arg	Lys
Ile	Ile	Leu 195	Thr	Ala	Ser	Gly	Gly 200	Ala	Phe	Arg	Asp	Trp 205		Va1	Glu
Lys	Leu 210	Lys	Glu	Val	Lys	Val 215	Ala	Asp	Ala	Leu	Lys 220		Pro	Asn	Trp
Asn 225		Gly	Lys	Lys	Ile 230		Val	Asp	Ser	Ala 235		Leu	Phe	Asn	Lys 240

Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp

Asp Ile Glu Ile Val Ile His Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile 

WO 00/65036 PCT/EP00/03465

Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg 

Pro Val His Ala 

#### (12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro





(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 2. November 2000 (02.11.2000)

#### (10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 00/65036 A3

(51) Internationale Patentklassifikation7: 15/52, 9/04, 15/66, 15/82, A01H 1/00

BASF AKTIENGE-(74) Gemeinsamer Vertreter: SELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/03465

C12N 15/29,

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. April 2000 (17.04.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 199 18 949.8

27. April 1999 (27.04.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHTENTHALER, Hartmut [DE/DE]; Im Kennental 17, D-76227 Karlsruhe (DE). SCHWENDER, Jörg [DE/DE]; Seltenbachstrasse 5, D-76327 Pfinztal (DE). REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,

HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,

LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht:

Mit internationalem Recherchenhericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

19. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: OVEREXPRESSION OF A DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DESOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE RE-**DUCTOISOMERASE IN PLANTS** 

ÜBEREXPRESSION EINER DNA-SEQUENZ CODIEREND FÜR EINE 1-DESOXY-D-XYLU-(54) Bezeichnung: LOSE-5-PHOSPHAT REDUKTOISOMERASE IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing plants containing increased quantities of tocopherols, vitamin K, carotinoids, chlorophylls and polyterpenes by overexpression of a DXPRI gene.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Carotinoiden, Chlorophyllen und Polyterpenen durch Überexpression eines DXPRI-Gens.



Intern Application No PCT/Er 00/03465

A. CLASSI IPC 7	FICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/29 C12N15/52 C12N9/04 A01H1/00	.C12N15/66 C12N15/82
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification	ation and IPC
	SEARCHED	
Minimum do IPC 7	cumentation searched (classification system followed by classification C12N	on symbols)
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that s	uch documents are included in the fields searched
İ	ata base consulted during the international search (name of data bas ternal, WPI Data, PAJ, STRAND	se and, where practical, search terms used)
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	evant passages Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROT SEQUENCES, 4 February 1995 (1995-02-04), XP HINXTON, GB AC = T43949. 7212 Lambda-PRL2 Ar thaliana cDNA clone 120E8T7, mRNA sequence. EST. abstract	2002151225 Pabidopsis
X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROT SEQUENCES, 13 September 1997 (1997-09-13), XP002151226 HINXTON, GB AC = AA586087. 28736 Lambda-PRL2 Arabidopsis thaliana cDNA clone 6 3', mRNA sequence. EST. abstract	
Y Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	Y Patent family members are listed in annex.
	her documents are listed in the continuation of box C.	T' later document published after the international filing date
consider of filing of the citation of the cita	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is died to establish the publication date of another nor other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  "&" document member of the same patent family
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
	6 October 2000	09/11/2000 Authorized officer
Name and (	mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  Fay: (-31-70) 340-3016	Mateo Rosell, A.M.

Intern II Application No PCT/EP 00/03465

	PC1/EP 00/03405		
	Relevant to daim No.		
Ortalian of deciment, was intracated the rate appropriate, or the resonant passages	Melevan to dan Mo.		
TAKAHASHI S ET AL: "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosysnthesis"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 95, August 1998 (1998-08), pages 9879-9884, XP002136183 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,3		
KUZUYAMA T ET AL: "Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis" TETRAHEDRON LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 39, no. 43, 22 October 1998 (1998-10-22), pages 7913-7916, XP004137840 ISSN: 0040-4039 cited in the application the whole document	1,3		
KUZUYAMA ET AL: "Direct formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphate Reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 39, 1998, pages 4509-4512-44512, XP002116675 ISSN: 0040-4039 the whole document	1,3		
LANGE B M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, vol. 365, no. 1, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 170-174, XP000864553 ISSN: 0003-9861 the whole document	1-8		
	5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosysnthesis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE WASHINGTON, vol. 95, August 1998 (1998-08), pages 9879-9884, XP002136183 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document  KUZUYAMA T ET AL: "Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis" TETRAHEDRON LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 39, no. 43, 22 October 1998 (1998-10-22), pages 7913-7916, XP004137840 ISSN: 0040-4039 cited in the application the whole document  KUZUYAMA ET AL: "Direct formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphate Reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate" TETRAHEDRON LETTERS,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM,NL, vol. 39, 1998, pages 4509-4512-44512, XP002116675 ISSN: 0040-4039 the whole document  LANGE B M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS,NEW YORK, US,US, vol. 365, no. 1, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 170-174, XP000864553 ISSN: 0003-9861 the whole document		

Intern, I Application No PCT/EP 00/03465

		PC1/EF 00/03405
	otton) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
ategory °	Citation of document, with a responsibility of the citation of	
, x	SCHWENDER ET AL: "Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of Arabidopsis thaliana" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 455, July 1999 (1999-07), pages 140-144, XP002132424 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-8
Ρ,Χ	WO 00 17233 A (JOMAA HASSAN) 30 March 2000 (2000-03-30) the whole document	. 1
E	WO 00 42205 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH; NOVARTIS AG (CH); BUDZISZEWSKI GREGO) 20 July 2000 (2000-07-20) SEQ.ID.N.9,28 the whole document	1-8
E	WO 00 34448 A (DU PONT ; LEE JIAN MING (US); TAO YONG (US); CAHOON REBECCA E (US)) 15 June 2000 (2000-06-15) SEQ.ID.N.17 the whole document	1-8
E	WO 00 46346 A (LANGE BERND M ;UNIV WASHINGTON (US); CROTEAU RODNEY B (US)) 10 August 2000 (2000-08-10) the whole document	1-8
	·	

mation on patent family members

Internal at Application No PCT/LY 00/03465

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0017233	A	30-03-2000	DE 19923567 A AU 4481699 A AU 4615599 A AU 6194799 A WO 9952938 A WO 9966875 A	06-04-2000 01-11-1999 10-01-2000 10-04-2000 21-10-1999 29-12-1999
WO 0042205	Α	20-07-2000	NONE	
WO 0034448	A	15-06-2000	AU 2163300 A	26-06-2000
WO 0046346	A	10-08-2000	NONE	

Interna les Aktenzeichen PCT/Lr 00/03465

a. KLASSII IPK 7	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12N15/29 C12N15/52 C12N9/04 A01H1/00	C12N15/66 C12N1	5/82
Nach der Int	temationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassi	ifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C 12N	))	
Recherchie	ne aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	eit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und evtl. verwendete S	Suchbegriffe)
EPO-In	ternal, WPI Data, PAJ, STRAND		
C. ALS WE	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
х	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTE	EIN	1
	4. Februar 1995 (1995-02-04), XPO HINXTON, GB		
	AC = T43949. 7212 Lambda-PRL2 Ara thaliana cDNA clone 120E8T7, mRNA	abidopsis	
	sequence. EST. Zusammenfassung		
X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTE	EIN	1
	SEQUENCES, 13. September 1997 (1997-09-13),		
	XP002151226 HINXTON, GB		
	AC = AA586087. 28736 Lambda-PRL2	C   1   V   D	
	Arabidopsis thaliana cDNA clone 6 3', mRNA sequence. EST.	OL TIVL	
	Zusammenfassung		
		/	
<u> </u>			<u> </u>
	ritere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu mehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröff aber	entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	T° Spätere Veröffentlichung, die nach den oder dem Prioniätsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidert, sondem nu Erfindung zugrundeliegenden Prinzips	nt worden ist und mit der ur zum Verständnis des der
"L" Veröffe	entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	Theorie ängegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bede kann allein aufgrund dieser Veröffentli	ichung nicht als neu oder auf
schei	inen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer rein Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	erfinderischer Tätigkeit beruhend betr "Y" Veröffentlichung von besonderer Bede kann nicht als auf erfinderischer Tätig	achtet werden autung; die beanspruchte Erfindung keit beruhend betrachtet
ausg	eführt) fentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	werden, wenn die Veröffentlichung mi Veröffentlichungen dieser Kategorie in	it einer oder mehreren anderen n Verbindung gebracht wird und
'P' Veröff	Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht lendlichung, die vor dem internationalen Anmededatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	diese Verbindung für einen Fachmann *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselbe	
	s Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen R	echerchenberichts
	26. Oktober 2000	09/11/2000	
Name und	d Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.	Mateo Rosell, A.I	М _

Interny les Aktenzeichen
PCT/EP 00/03465

C /Contract	TOTAL ALC WESCHELICU ANGESCHENE HAGESI ACEN	PC1/EF 00	<u> </u>
Kategorie*	zung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	nenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TAKAHASHI S ET AL: "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosysnthesis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 95, August 1998 (1998-08), Seiten 9879-9884, XP002136183 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument		1,3
A	KUZUYAMA T ET AL: "Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis" TETRAHEDRON LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 39, Nr. 43, 22. Oktober 1998 (1998-10-22), Seiten 7913-7916, XP004137840 ISSN: 0040-4039 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument		1,3
A	KUZUYAMA ET AL: "Direct formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphate Reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 39, 1998, Seiten 4509-4512-44512, XP002116675 ISSN: 0040-4039 das ganze Dokument		1,3
P, X	LANGE B M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS,NEW YORK, US,US, Bd. 365, Nr. 1, 1. Mai 1999 (1999-05-01), Seiten 170-174, XP000864553 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument		1-8

Interna es Aktenzeichen
PCT/EY 00/03465

	101/21	PC1/EP 00/03405		
C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.		
P,X	SCHWENDER ET AL: "Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of Arabidopsis thaliana" FEBS LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 455, Juli 1999 (1999-07), Seiten 140-144, XP002132424 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument	1-8		
P,X	WO 00 17233 A (JOMAA HASSAN) 30. März 2000 (2000-03-30) das ganze Dokument	1		
E	WO 00 42205 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); BUDZISZEWSKI GREGO) 20. Juli 2000 (2000-07-20) SEQ.ID.N.9,28 das ganze Dokument	1-8		
E	WO OO 34448 A (DU PONT ;LEE JIAN MING (US); TAO YONG (US); CAHOON REBECCA E (US)) 15. Juni 2000 (2000-06-15) SEQ.ID.N.17 das ganze Dokument	1-8		
Ε	WO 00 46346 A (LANGE BERND M ;UNIV WASHINGTON (US); CROTEAU RODNEY B (US)) 10. August 2000 (2000-08-10) das ganze Dokument	1-8		

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internz es Aktenzeichen
PCT/EP 00/03465

Im Recherchenberich angeführtes Patentdokur		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentlamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 0017233	A	30-03-2000	DE 19923567 A AU 4481699 A AU 4615599 A AU 6194799 A WO 9952938 A WO 9966875 A	06-04-2000 01-11-1999 10-01-2000 10-04-2000 21-10-1999 29-12-1999	
WO 0042205	Α	20-07-2000	KEINE		
WO 0034448	Α	15-06-2000	AU 2163300 A	26-06-2000	
WO 0046346	Α	10-08-2000	KEINE		